

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

Computer machine assisted translation of Japanese patent document

JP05045328A

Date of publication: 23.02.1993

Bibliography

(19) [Publication country] Japan Patent Office (JP)
(12) [Kind of official gazette] Open patent official report (A)
(11) [Publication No.] JP,5-45328,A
(43) [Date of Publication] February 23, Heisei 5 (1993)
(54) [Title of the Invention] pH conversion mold glucose sensor and a sensor plate
(51) [The 5th edition of International Patent Classification]
G01N 27/327
[FI]
G01N 27/30 353 B 7235-2J
353 J 7235-2J
[Request for Examination] Un-asking.
[The number of claims] 2
[Number of Pages] 5
(21) [Application number] Japanese Patent Application No. 3-287352
(22) [Filing date] August 13, Heisei 3 (1991)
(71) [Applicant]
[Identification Number] 000204284
[Name] Taiyo Yuden Co., Ltd.
[Address] 6-16-20, Ueno, Taito-ku, Tokyo
(72) [Inventor(s)]
[Name] Mochizuki Akihiko
[Address] Inside of 6-16-20, Ueno, Taito-ku, Tokyo Taiyo Yuden Co., Ltd.
(74) [Attorney]
[Patent Attorney]
[Name] Sano **

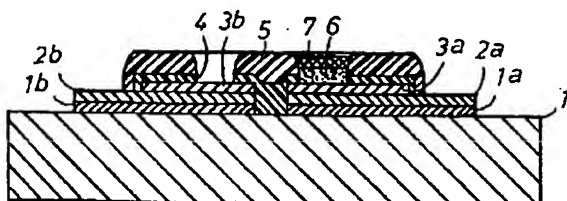
Epitome

(57) [Abstract]

The [purpose] The sensibility of pH conversion mold glucose sensor is improved.

[Configuration] Make a catalase live together, disassemble the hydrogen peroxide generated in case GOD (glucose oxidase) oxidizes a glucose, and oxygen is made to emit, lilac IKURU use of this oxygen is carried out, GOD is restored, and that enzyme reaction is promoted.

[Effectiveness] Since recycle use of the oxygen is carried out, oxidation reaction of the glucose of a sample can be promoted and pH detection sensitivity based on the gluconic acid of the oxide of a glucose can be raised.



CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The pH conversion mold glucose sensor which made this oxidizing-enzyme fixed film contain the hydrogen-peroxide dialytic ferment which disassembles the hydrogen peroxide which generates in the pH conversion mold glucose sensor which enabled it to detect electrically pH induction value by conversion to the gluconic acid of the glucose of specimen liquid using the electrode which has the induction film which carried out the laminating of pH induction film and the oxidizing-enzyme fixed film one by one in case the above-mentioned oxidizing-enzyme fixed film changes the above-mentioned glucose into a gluconic acid, and emits oxygen.

[Claim 2] The separation electrode which are the components of a biosensor according to claim 1, and is used for the substrate of an electric amplifying circuit, connecting with the input electrode of this electric amplifying circuit on the insulating substrate of another object, Prepare a separation reference electrode, and carry out the laminating of pH induction film and the oxidizing-enzyme fixed film one by one, and they are prepared in the above-mentioned separation electrode. The sensor plate which made this oxidizing-enzyme fixed film contain the hydrogen-peroxide dialytic ferment which disassembles the hydrogen peroxide generated in case this oxidizing-enzyme fixed film changes the above-mentioned glucose into a gluconic acid, and emits oxygen.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

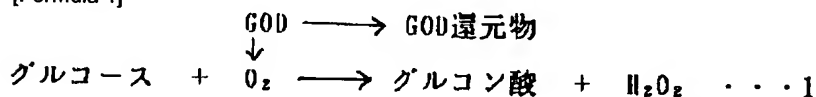
[Industrial Application] Especially this invention relates to pH mold glucose sensor which has improved sensibility, and its sensor plate.

[0002]

[Description of the Prior Art] Various methods are learned by the glucose sensor for measuring the glucose concentration in a solution. These principles are common in that the enzyme reaction of the glucose oxidase (it calls for short Following GOD) shown below is used.

[0003]

[Formula 1]



[0004] However, the matter detected differs at the point which is oxygen with which the above-mentioned chemical formula 1 is consumed, is the hydrogen peroxide to generate, or is a gluconic acid. The various tolan juicers which change and detect concentration change of each of these matter to electric physical quantity can be considered. For example, if change of the hydrogen ion concentration dissociated from a gluconic acid is detected using pH induction electrode, the glucose sensor of pH conversion mold will be obtained.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the thing of the structure which carried out the laminating of pH induction film and the GOD fixed film to the electrode one by one was proposed by previous application as a pH induction electrode, the above-mentioned enzyme reaction balanced for a short time comparatively, and the glucose sensor of pH conversion mold using this pH induction electrode had the small potential variation (signal variation) accompanying pH change obtained, and had a technical problem in respect of precision and resolution. Moreover, the technical problem of an equilibrium point changing also with oxygen contents, such as a sample to be used, occurred. It is mentioned that rate-limiting [of the GOD enzyme reaction] is carried out by the oxygen density as one of the cause of the.

[0006] The purpose of this invention is to improve the sensibility of pH conversion mold glucose sensor.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In pH conversion mold glucose sensor which enabled it to detect electrically pH induction value by conversion to the gluconic acid of the glucose of specimen liquid using the electrode which has the induction film which carried out the laminating of pH induction film and the oxidizing-enzyme fixed film one by one in order that this invention may solve the above-mentioned technical problem The hydrogen peroxide generated in case the above-mentioned oxidizing-enzyme fixed film changes the above-mentioned glucose into a gluconic acid is disassembled, and it is in offering pH conversion mold glucose sensor which made this oxidizing-enzyme fixed film contain the hydrogen-peroxide dialytic ferment which emits oxygen.

[0008] Moreover, the separation electrode which are the components of pH conversion mold glucose sensor, and is used for the substrate of an electric amplifying circuit, connecting with the input electrode of this electric amplifying circuit on the insulating substrate of another object, Prepare a separation reference electrode, and carry out the laminating of pH induction film and the oxidizing-enzyme fixed film one by one, and they are prepared in the above-mentioned separation electrode. The hydrogen peroxide generated in case this oxidizing-enzyme fixed film changes the above-mentioned glucose into a gluconic acid is disassembled, and it is in offering the sensor plate which made this oxidizing-enzyme fixed

film contain the hydrogen-peroxide dialytic ferment which emits oxygen.

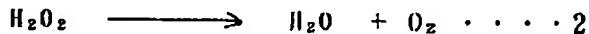
[0009]

[Function] The reaction of the following chemical formula 2 is made to cause, and the above-mentioned chemical formula 1 is made to conjugate this by making a hydrogen-peroxide dialytic ferment, for example, a catalase, live together on the oxidizing-enzyme fixed film.

[0010]

[Formula 2]

カタラーゼ



[0011] Here, a catalase decomposes the hydrogen peroxide generated with the chemical formula 1 with a chemical formula 2, oxygen is generated, and if this oxygen is used for oxidation of GOD used and returned with the chemical formula 1, the reaction balance of a chemical formula 1 can be moved to right-hand side. Thus, since the amount of generation of a gluconic acid can be made [many] by recycling and using oxygen, hydrogen-ion-concentration change dissociated from a gluconic acid and potential change (the amount of signals) which becomes large and detects this become large.

[0012]

[Example] Next, the example of this invention is explained based on a drawing.

As shown in example 1 drawing 1 and drawing 2, **** butter NINGU of the copper foil pasted up on the paper polyester substrate 1 was carried out at the phot graphic method, it carried out surface polish after that, and the copper electrodes 1a and 1b of a smooth predetermined configuration were formed. Next, for 5 seconds, where the above-mentioned copper electrodes 1a and 1b are set using the commercial cyanogen system silver strike plating bath and commercial constant current power supply which carry out 1 g/l content so that cathode and a platinum plating titanium mesh may be made into an anode plate and cathode current density may become 0.5 A/dm² (0.5A per decimeter) about them, the above-mentioned substrate was taken out and rinsed, after being immersed during the bath. Subsequently, electrolytic plating was performed for 30 seconds per minute by cathode-current-density 1.2 A/dm², having been immersed holding at the temperature of 50 degrees C in the cyanogen system electrolysis silver bright plating liquid of marketing which carries out silver 20 g/l content, and having used cathode and a platinum plating titanium mesh as the anode plate for the above-mentioned copper electrodes 1a and 1b, and silver larer 2a and 2b of 15 micrometers were formed in copper electrodes 1a and 1b, respectively. Then, in the hydrochloric acid (HCl) of a decinormal (N), the anode plate and the titanium mesh electrode which carried out platinum plating were used as cathode, electrolysis processing of the above-mentioned substrate was carried out for 2 minutes and 40 seconds with anode current density (0.2 A/dm²), and the silver chloride layers 3a and 3b were formed in the front face of silver larer 2a and 2b.

[0013] Next, except for a part for the part of silver chloride layer 3b used as a connection **** reference electrode, and the terminal area for external contacts, the epoxy resin layer 4 was formed with the part which forms, the part, i.e., below-mentioned pH induction film, of silver chloride layer 3a, and this part and specimen liquid. pH induction film 6 is formed in the part which did not cover the epoxy resin layer 4 with the above-mentioned silver chloride layer 3a. This pH induction film 6 consists of tridodecylamine 1% dioctyl adipate 67% polyvinyl chloride system polymer 32% which the weight composition ratio of vinyl chloride:vinyl acetate:vinyl alcohol becomes from 9:3:6. As it indicated drawing 2 that the part which was not covered with the above-mentioned pH induction film 6 and the epoxy resin layer 4 of silver chloride layer 3b is surrounded, the levee body 5 which consists of adhesive tape of polyethylene terephthalate was formed.

[0014]

Then, TORIETOKISHI vinylsilane 10% Water 10% Methanol 10micro of solutions I which consist of 80% is dropped on pH induction film 6 surrounded by the levee body 5, and they are left for 5 minutes. Then, after removing the remaining liquid which is not absorbed by pH induction film 6 by BENKOTTON, it was left in the room temperature for 2 hours, and the vinyl silyl radical was made to react to the above-mentioned vinyl chloride system polymer.

[0015] Next, on this pH induction film 6, it is the following, and enzyme immobilized membrane 7 is made and formed. Gel base resin (the Kansai Paint Co., Ltd. make, ENTG 2000) 1.00g Polymerization initiator (Kansai Paint Co., Ltd. make) 0.05g 50mg /ml] glucose oxidase (EC.1.1.3.4)

Solution (Wako Pure Chem industrial company make) 201U/mg 0.5ml 50mg /ml] catalase solution (the Wako Pure Chem king business company make) 7500U/mg The constituent which consists of 0.5 ml is mixed in a test tube, the 4-5microl is dropped on the above-mentioned pH induction film 6, this is irradiated for 3 minutes with an ultraviolet ray lamp, and it considers as enzyme immobilized membrane 7. Thus, a bridge is constructed over the vinyl chloride system polymer of pH induction film, and the above-mentioned base resin of enzyme immobilized membrane by TORIETOKISHI vinylsilane, and pH induction film and enzyme immobilized membrane are firmly pasted up by the chemical bond. After dipping the whole enzyme-immobilized-membrane formation back in phosphoric-acid buffer solution and extracting the unreacted object of the above-mentioned constituent, it washed and dried and the glucose sensor plate was obtained.

[0016] By connecting to electric amplifying-circuit equipment the potential between the electrodes and Ag/AgCl reference electrodes which carried out the laminating of an ion sensing membrane and the enzyme immobilized membrane one by one, and prepared them, and dropping specimen liquid ranging over the enzyme immobilized membrane and the exposed part of silver chloride layer 3b as a reference electrode which were surrounded by the above-mentioned levee body, the above-mentioned glucose sensor plate can make the content glucose concentration the output value of an ion sensor, and can measure it.

[0017] In example 2 example 1, the glucose sensor plate was similarly produced except having changed as follows the constituent which obtains enzyme immobilized membrane, and having used it.

Gel base resin (the Kansai Paint Co., Ltd. make, ENTG 2000) 1.00g Polymerization initiator (Kansai Paint Co., Ltd. make) 0.05g 50mg [ml] glucose oxidase (EC.1.1.3.4)

Solution (Wako Pure Chem industrial company make) 201U/mg 0.5ml 50mg [ml] catalase solution (Wako Pure Chem industrial company make) 7500U/mg 0.05ml [0018] In the example example 1 of a comparison, the glucose sensor plate was similarly produced except having changed as follows the constituent which obtains enzyme immobilized membrane, and having used it.

Gel base resin (the Kansai Paint Co., Ltd. make, ENTG 2000) 1.00g Polymerization initiator (Kansai Paint Co., Ltd. make) 0.05g 50mg [ml] glucose oxidase (EC.1.1.3.4)

Solution (Wako Pure Chem industrial company make) 201U/mg 0.5ml [0019] It produced respectively 20 glucose sensor plates of the above-mentioned examples 1 and 2 and the example of a comparison at a time, the sensor output value in 25 degrees C was calculated, and the typical output pattern was shown in drawing 3. Furthermore, pH conversion rate average calculated from these output patterns, i.e., a sensibility average, and the variation in 20 sheets are shown in Table 1. In addition, front Naka and relative velocity are the relative values which set pH conversion rate average of the example of a comparison to 100.

[0020]

[Table 1]

	pH変換速度平均 (mV/分)	バラツキ (mV/分)	相対速度
実施例 1	10.9	1.5	138
実施例 2	8.9	0.7	113
比較例	7.9	1.3	100

[0021] In addition, the following solutions were used as a sample at this time.

10mM(s) Phosphate buffer solution (pH7.40)

100mM(s) NaCl200 mg/dl Glucose [0022] From the above-mentioned result, as for the thing of examples 1 and 2, the increment in 38% and 13% of pH conversion rate average, i.e., the increment in sensibility, was accepted compared with the example thing thing of a comparison.

[0023] In addition, although the constituent which forms enzyme immobilized membrane was made to contain a catalase, after forming enzyme immobilized membrane, it may be immersed in hydrogen-peroxide dialytic ferment solutions, such as a catalase, and enzyme immobilized membrane may be made to contain a hydrogen-peroxide dialytic ferment.

Moreover, although pH induction film was made to contain TORIETOKISHI vinylsilane, the spreading solution of enzyme immobilized membrane may be made to contain, the spreading film may be formed on pH induction film, and may carry out a polymerization, and a TORIETOKISHIPI nil silane layer may be formed by spreading of the liquid etc. between enzyme immobilized membrane and pH induction film.

[0024] Moreover, as an example of the polyvinyl chloride system polymer used for pH induction film, GKT ** 2000 (DENKI KAGAKU KOGYO K.K. make) is mentioned. When using the thing of the photoresist which has an ethylene nature partial saturation radical in both ends as the polymer used for enzyme immobilized membrane, or a prepolymer mainly by making a polyethylene glycol (PEG) and a polypropylene glycol (PPG) into a frame, ENT-1000, -2000, -3400, ENTG-2000, -3800, ENTP-1000, -2000, -3000, -4000, ENTV-500 (Kansai Paint Co., Ltd. make), etc. are mentioned. An ENTP system is hydrophobicity. In addition, it is indicated by the Japanese-Patent-Application-No. No. 250051 [two to] specification for details, and the thing indicated can use it similarly in this application.

[0025]

[Effect of the Invention] In pH conversion mold glucose sensor, by making a hydrogen-peroxide dialytic ferment live together with GOD in enzyme immobilized membrane, the oxygen used as the substrate of the enzyme reaction of GOD can be recycled and used, and, according to this invention, the oxygen dependency of the reaction by the oxygen which exists in the inside of a sample or enzyme immobilized membrane, i.e., reaction **** of oxygen, can be abolished.

[0026] Moreover, since the reaction by the enzyme is controllable by existence of a hydrogen-peroxide dialytic ferment in this way, improvement in the reaction rate, i.e., sensibility, can be raised, and the variation of measured value can be taken sharply. Therefore, a S/N ratio can be improved sharply and the precision of measured value and resolution can be improved remarkably.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the top view of pH conversion mold glucose sensor plate of one example of this invention.

[Drawing 2] It is the II-II sectional view of drawing 1.

[Drawing 3] It is the graph which shows aging of the output of pH conversion mold glucose sensor of the example of this invention, and the example of a comparison.

[Description of Notations]

2a, 2b Silver layer of an electrode

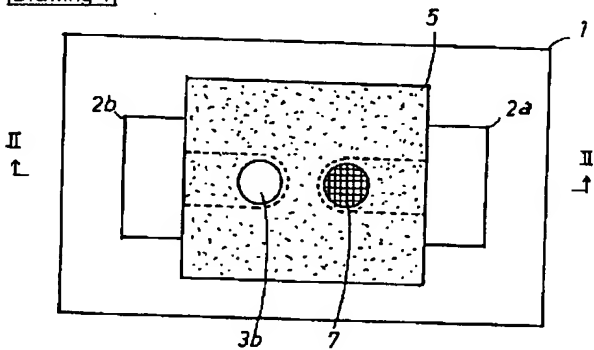
3a, 3b Silver chloride layer of an electrode

6 PH Induction Film

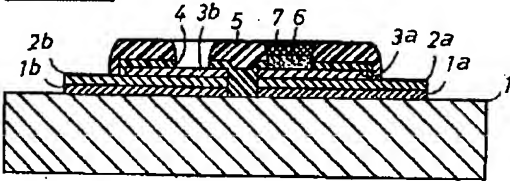
7 Enzyme Immobilized Membrane

DRAWINGS

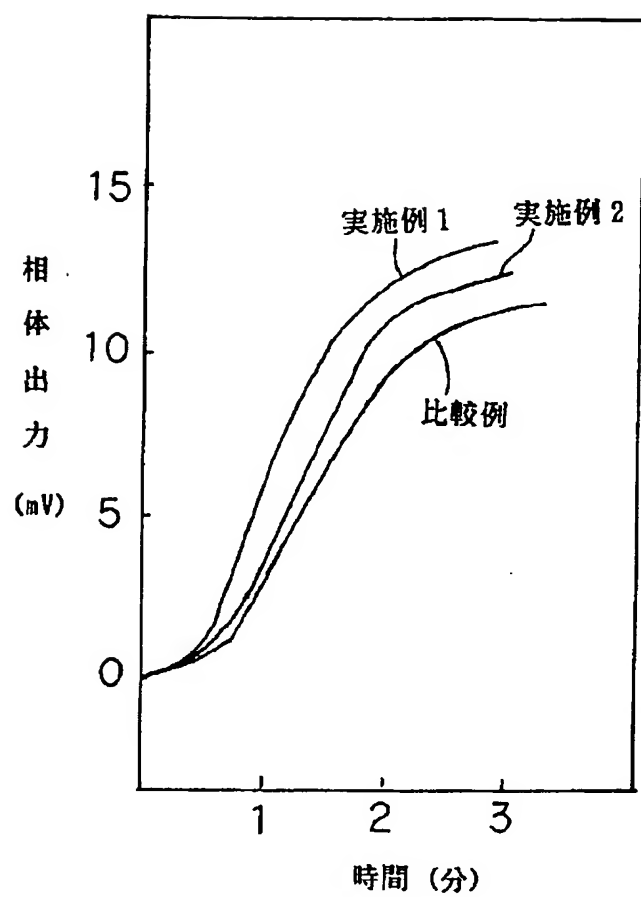
[Drawing 1]



[Drawing 2]



[Drawing 3]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-45328

(43) 公開日 平成5年(1993)2月23日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327		7235-2 J	G 0 1 N 27/30	3 5 3 B
		7235-2 J		3 5 3 J

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21) 出願番号 特願平3-287352

(22) 出願日 平成3年(1991)8月13日

(71) 出願人 000204284

太陽誘電株式会社

東京都台東区上野6丁目16番20号

(72) 発明者 望月 明彦

東京都台東区上野6丁目16番20号太陽誘電
株式会社内

(74) 代理人 弁理士 佐野 忠

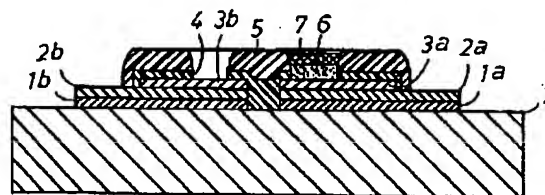
(54) 【発明の名称】 pH変換型グルコースセンサー及びセンサープレート

(57) 【要約】

〔目的〕 pH変換型グルコースセンサーの感度を改善する。

〔構成〕 GOD (グルコースオキシターゼ) がグルコースを酸化する際に発生する過酸化水素をカタラーゼを共存させて分解し酸素を放出させ、この酸素をリサイクル利用してGODを還元し、その酵素反応を促進する。

〔効果〕 酸素がリサイクル利用されるので、試料のグルコースの酸化反応を促進することができ、グルコースの酸化物のグルコン酸に基づくpH検出感度を高めることができる。

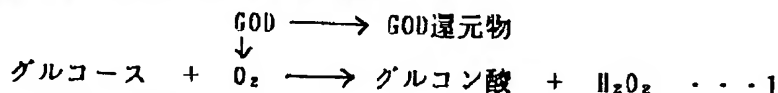


1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 pH感応膜と酸化酵素固定膜を順次積層した感応膜を有する電極を用いて検体液のグルコースのグルコン酸への変換によるpH感応値を電気的に検出できるようにしたpH変換型グルコースセンサーにおいて、上記酸化酵素固定膜が上記グルコースをグルコン酸に変換する際に生成する過酸化水素を分解し、酸素を放出する過酸化水素分解酵素を該酸化酵素固定膜に含有させたpH変換型グルコースセンサー。

【請求項2】 請求項1記載のバイオセンサの部品であって、電気的増幅回路の基板とは別体の絶縁性基板上に該電気的増幅回路の入力電極と接続して使用する分離電極と、分離比較電極を設け、上記分離電極にpH感応膜と酸化酵素固定膜を順次積層して設け、該酸化酵素固定膜が上記グルコースをグルコン酸に変換する際に生成する過酸化水素を分解し、酸素を放出する過酸化水素分解*



【0004】しかし、検出される物質が上記化学式1の消費される酸素であったり、生成する過酸化水素であったり、グルコン酸であったりする点で異なる。これらのそれぞれの物質の濃度変化を電気的物理量に変換して検出する種々のトランジューサーが考えられる。たとえばグルコン酸より解離する水素イオン濃度の変化をpH感応電極を用いて検出すると、pH変換型のグルコースセンサーが得られる。

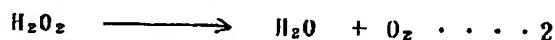
【0005】

【発明が解決しようとする課題】 pH感応電極としては、pH感応膜とGOD固定膜を電極に順次積層した構造のものを先の出願で提案したが、このpH感応電極を用いたpH変換型のグルコースセンサーは、比較的短時間に上記の酵素反応が平衡してしまい、得られるpH変化に伴う電位変化量（信号変化量）が小さく、精度、分解能の点で課題があった。また、用いる試料等の酸素含量によっても平衡点が異なってくるなどの課題があった。その原因の一つとして酸素濃度によりGOD酵素反応が律速されることが挙げられる。

【0006】本発明の目的は、pH変換型グルコースセンサーの感度を改善することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記課題を解決するために、pH感応膜と酸化酵素固定膜を順次積層※
カタラーゼ



【0011】ここで、化学式1で生成した過酸化水素を化学式2でカタラーゼにより分解して酸素を生成し、この酸素を化学式1で使用され還元されたGODの酸化に利用すれば、化学式1の反応平衡を右側に移動させるこ

2

*酵素を該酸化酵素固定膜に含有させたセンサープレート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、特に感度を改善したpH型グルコースセンサー及びそのセンサープレートに関する。

【0002】

【従来の技術】 溶液中のグルコース濃度を測定するためのグルコースセンサーには種々の方式が知られている。これらの原理は、次に示すグルコースオキシターゼ（以下GODと略称する）の酵素反応を利用する点では共通している。

【0003】

【化1】

※した感応膜を有する電極を用いて検体液のグルコースのグルコン酸への変換によるpH感応値を電気的に検出できるようにしたpH変換型グルコースセンサーにおいて、上記酸化酵素固定膜が上記グルコースをグルコン酸に変換する際に生成する過酸化水素を分解し、酸素を放出する過酸化水素分解酵素を該酸化酵素固定膜に含有させたpH変換型グルコースセンサーを提供することにある。

【0008】また、pH変換型グルコースセンサーの部品であって、電気的増幅回路の基板とは別体の絶縁性基板上に該電気的増幅回路の入力電極と接続して使用する分離電極と、分離比較電極を設け、上記分離電極にpH感応膜と酸化酵素固定膜を順次積層して設け、該酸化酵素固定膜が上記グルコースをグルコン酸に変換する際に生成する過酸化水素を分解し、酸素を放出する過酸化水素分解酵素を該酸化酵素固定膜に含有させたセンサープレートを提供することにある。

【0009】

【作用】 酸化酵素固定膜に過酸化水素分解酵素、たとえばカタラーゼを共存させることにより、次の化学式2の反応を起こさせ、これを上記化学式1に共役させる。

【0010】

【化2】

とができる。このように酸素をリサイクルして利用することにより、グルコン酸の生成量を多くすることができ、グルコン酸から解離する水素イオン濃度変化も大きくなり、これを検出する電位変化（信号量）も大き

くなる。

【0012】

【実施例】次に本発明の実施例を図面に基いて説明する。

実施例1

図1及び図2に示すように、紙ポリエステル基板1に接着された銅箔をホットグラフィック法によたバターニングし、その後表面研磨し、平滑な所定形状の銅電極1a、1bを形成した。次に1g/l含有する市販のシアン系銀スライク・メッキ浴と定電流電源を用いて、上記銅電極1a、1bを陰極、白金メッキチタンメッシュを陽極とし、陰極電流密度が0.5A/dm²（1デシメートル当たり0.5アンペア）になるようにセットした状態で、5秒間上記基板を浴中に浸漬した後、取り出して水洗した。ついで、銀20g/l含有する市販のシアン系電解銀光沢メッキ液に温度50℃にて保持したまま浸漬し、上記銅電極1a、1bを陰極、白金メッキチタンメッシュを陽極として、陰極電流密度1.2A/dm²で1分30秒間電解メッキを施し、銅電極1a、1bにそれぞれ15μmの銀層2a、2bを形成した。その*20

この後、トリエトキシビニルシラン	10%
水	10%
メタノール	80%

よりなる溶液10μlを堤体5で囲まれたpH感応膜6上に滴下し、5分間放置する。その後、ベンコトtonでpH感応膜6に吸収されない残りの液を取り除いた後、2時間室温に放置し、ビニルシリル基を上記塩化ビニル※

ゲル主剤（関西ペイント社製、ENTG 2000）	1.00g
重合開始剤（関西ペイント社製）	0.05g
50mg/mlグルコースオキシターゼ（EC. 1. 1. 3. 4）	
溶液（和光純薬工業社製） 201U/mg	0.5ml
50mg/mlカタラーゼ溶液	
（和光純薬工業社製） 7500U/mg	0.5ml

からなる組成物を試験管中に混合し、その4~5μlを上記pH感応膜6の上に滴下し、これを紫外線ランプにより3分間照射し、酵素固定膜7とする。このようにしてpH感応膜の塩化ビニル系ポリマーと酵素固定膜の上記主剤とがトリエトキシビニルシランにより架橋され、pH感応膜と酵素固定膜は化学結合により強固に接着される。酵素固定膜形成後全体をリン酸緩衝溶液に浸し、40 上記組成物の未反応物を抽出した後、洗浄、乾燥してグルコースセンサープレートを得た。

【0016】上記のグリコースセンサープレートは、イ★

ゲル主剤（関西ペイント社製、ENTG 2000）	1.00g
重合開始剤（関西ペイント社製）	0.05g
50mg/mlグルコースオキシターゼ（EC. 1. 1. 3. 4）	
溶液（和光純薬工業社製） 201U/mg	0.5ml
50mg/mlカタラーゼ溶液	
（和光純薬工業社製） 7500U/mg	0.05ml

【0018】比較例

*後、0.1規定（N）の塩酸（HCl）中で、上記基板を陽極、白金メッキしたチタンメッシュ電極を陰極とし、陽極電流密度（0.2A/dm²）で2分40秒間電解処理し、銀層2a、2bの表面に塩化銀層3a、3bを形成した。

【0013】次に、塩化銀層3aの一部、すなわち後述のpH感応膜を形成する部分、この部分と検体液で接続される比較電極となる塩化銀層3bの部分及び外部接点用端子部分を除いてエポキシ樹脂層4を形成した。上記塩化銀層3aで、エポキシ樹脂層4を被覆しなかった部分にpH感応膜6を形成する。このpH感応膜6は、塩化ビニル：酢酸ビニル：ビニルアルコールの重量組成比が9：3：6よりなるポリ塩化ビニル系ポリマー32%、ジオクチルアジペイト67%、トリドデシルアミン1%からなる。上記pH感応膜6と、塩化銀層3bのエポキシ樹脂層4で被覆しなかった部分を囲むように図2に示す如く、ポリエチレンテレフタレート（PET）の粘着テープよりなる堤体5を形成した。

【0014】

※系ポリマーに反応させた。

【0015】次に、酵素固定膜7をこのpH感応膜6の上に以下のようにして形成する。

★オン感応膜及び酵素固定膜を順次積層して設けた電極とAg/AgCl比較電極との間の電位を電気的増幅回路装置に接続し、上記堤体に囲まれた酵素固定膜と比較電極としての塩化銀層3bの露出部分に跨がって検体液を滴下することにより、その含有グルコース濃度をイオンセンサの出力値とし測定することができる。

【0017】実施例2

実施例1において、酵素固定膜を得る組成物を以下のように変更して用いた以外は同様にしてグリコースセンサープレートを作製した。

ゲル主剤（関西ペイント社製、ENTG 2000）	1.00g
重合開始剤（関西ペイント社製）	0.05g
50mg/mlグルコースオキシターゼ（EC. 1. 1. 3. 4）	
溶液（和光純薬工業社製） 201U/mg	0.5ml
50mg/mlカタラーゼ溶液	
（和光純薬工業社製） 7500U/mg	0.05ml

50 実施例1において、酵素固定膜を得る組成物を以下のよ

5

6

うに変更して用いた以外は同様にしてグリコースセンサープレートを作製した。

ゲル主剤 (関西ペイント社製、ENTG 2000)	1.00g
重合開始剤 (関西ペイント社製)	0.05g
50mg/ml グリコースオキシダーゼ (EC. 1.1.3.4)	
溶液 (和光純薬工業社製) 201U/mg	0.5ml

【0019】上記実施例1、2及び比較例のグリコースセンサープレートを各々20枚づつ作製し、25℃におけるセンサー出力値を求め、その代表的出力パターンを図3に示した。さらに、これらの出力パターンより演算されたpH変換速度平均、すなわち感度平均及び20枚*10

*におけるバラツキを表1に示す。なお、表中、相対速度は比較例のpH変換速度平均を100とした相対値である。

【0020】

【表1】

	pH変換速度平均 (mV/分)	バラツキ (mV/分)	相対速度
実施例1	10.9	1.5	138
実施例2	8.9	0.7	113
比較例	7.9	1.3	100

【0021】なお、この際以下の溶液を試料として用いた。

10mM リン酸緩衝液 (pH7.40)

100mM NaCl

200mg/dl グリコース

【0022】上記結果から、実施例1、2のものは比較例のものに比べ、38%、13%のpH変換速度平均の増加、すなわち感度の増加が認められた。

【0023】なお、酵素固定膜を形成する組成物にカタラーゼを含有させたが、酵素固定膜を形成した後カタラーゼ等の過酸化水素分解酵素溶液に浸漬し、過酸化水素分解酵素を酵素固定膜に含有させても良い。また、トリエトキシビニルシランをpH感応膜に含有させたが、酵素固定膜の塗布溶液に含有させ、その塗布膜をpH感応膜上に形成し、重合させても良く、酵素固定膜とpH感応膜の間にトリエトキシビニルシラン層をその液の塗布等により形成しても良い。

【0024】また、pH感応膜に用いるポリ塩化ビニル系ポリマーの具体例としてはGKT井2000 (電気化学工業社製) が挙げられる。酵素固定膜に用いられるポリマー又はプレポリマーとして、主としてポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール (PPG) を骨格として両末端にエチレン性不飽和基を有する光硬化性のものを用いる場合には、ENT-1000、-2000、-3400、ENTG-2000、-3800、ENTP-1000、-2000、-3000、-4000及びENTV-500 (関西ペイント社製) 等が挙げられる。ENTP系は疎水性である。な

お、詳細は特願平2-250051号明細書に記載されており、本願においてもその記載されているものが同様に使用できる。

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、pH変換型グリコースセンサーにおいて、酵素固定膜中にGODとともに過酸化水素分解酵素を共存させることにより、GODの酵素反応の基質となる酸素をリサイクルして利用することができ、試料中や酵素固定膜に存在する酸素による反応の酸素依存性、すなわち酸素の反応律速をなくすることができる。

【0026】また、このように過酸化水素分解酵素の存在により酵素による反応を制御できるから、その反応速度の向上、すなわち感度を向上させることができ、測定値の変化量を大幅にとることができる。したがって、S/N比を大幅に改善することができ、測定値の精度、分解能を著しく向上することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例のpH変換型グリコースセンサープレートの平面図である。

【図2】図1のII-II断面図である

【図3】本発明の実施例と比較例のpH変換型グリコースセンサーの出力の経時変化を示すグラフである。

【符号の説明】

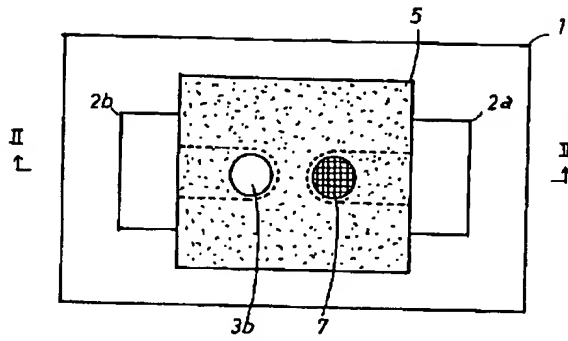
2a、2b 電極の銀層

3a、3b 電極の塩化銀層

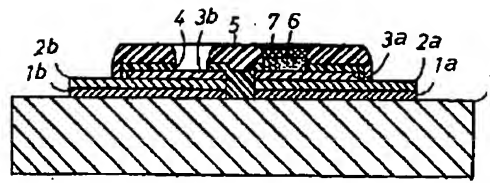
6 pH感応膜

7 酵素固定膜

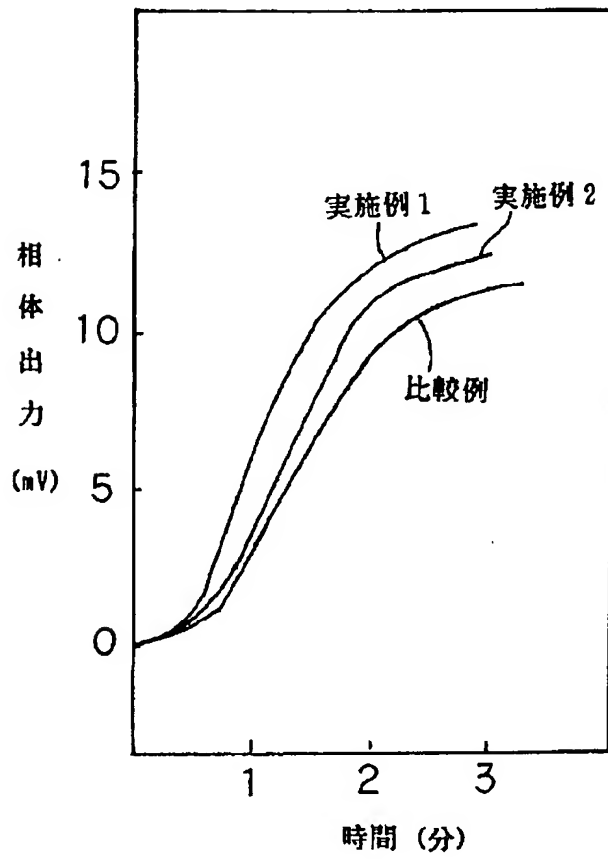
【図1】



【図2】



【図3】



THIS PAGE BLANK (10/27/75)